昆 虫 学 报 Acta Entomologica Sinica, June 2005, 48(3):353 - 358　　ISSN 0454-6296

嗜线虫致病杆菌 HB310 菌株杀虫蛋白的纯化及活性鉴定

王勤英[1],南宫自艳[1],陆秀君[1],李秀花[2],李国勋[1],崔　龙[1]

(1. 河北农业大学植物保护学院,河北省农业病虫害生物防治工程技术研究中心,河北保定　071001;
2. 河北省农林科学院植物保护研究所,河北保定　071000)

摘要:嗜线虫致病杆菌 *Xenorhabdus nematophila* HB310 是从河北省土壤中筛选出的一株昆虫病原线虫体内分离纯化获得的共生菌,该菌的发酵液对多种昆虫有较高的杀虫活性。利用 85%饱和度的硫酸铵盐析分别获得胞内蛋白提取物和上清液中胞外蛋白提取物,生测结果表明这两种蛋白提取物中都含有胃毒素和血腔毒素。通过制备型非变性凝胶电泳对蛋白提取物进行分离和纯化,得到了 3 种有杀虫活性的毒素蛋白(毒素Ⅰ、毒素Ⅱ和毒素Ⅲ),胞内的毒素蛋白与分泌到胞外上清液中的毒素蛋白是同种蛋白。毒素Ⅰ和毒素Ⅱ对棉铃虫初孵幼虫有明显的胃毒活性,但没有血腔毒性;毒素Ⅲ对大蜡螟幼虫有很强的血腔毒性,LD_{50}为 0.18 μg/头。SDS-PAGE 图谱显示毒素Ⅰ和毒素Ⅱ是由多个多肽组成的复合蛋白,而毒素Ⅲ只分离出一条多肽。毒素Ⅱ在 50℃处理 10 min,其杀虫活性没有显著变化;70℃处理 10 min 对毒素Ⅲ杀虫活性没有显著影响。

关键词:嗜线虫致病杆菌;毒素蛋白;纯化;杀虫活性

中图分类号:Q966　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:0454-6296(2005)03-0353-06

Purification of insecticidal proteins from *Xenorhabdus nematophila* HB310 and detection of their insecticidal activity

WANG Qin-Ying[1], NANGONG Zi-Yan[1], LU Xiu-Jun[1], LI Xiu-Hua[2], LI Guo-Xun[1], CUI Long[1] (1. College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Biocontrol Centre of Plant Diseases and Plant Pests of Hebei Province, Baoding, Hebei 071001, China; 2. Institute of Plant Protection, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Baoding, Hebei 071000, China)

Abstract: The extracts of extracellular and intracellular insecticidal proteins from *Xenorhabdus nematophila* HB310 strain, an entomopathogenic bacterium symbiotically associated with entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*, appeared high toxic activity by oral or injectable infection against several species of insects. Two oral insecticidal proteins, toxin Ⅰ and toxin Ⅱ, and another haemocoel insecticidal protein, toxin Ⅲ with injectable activity were purified from the intracellular protein extract by native-PAGE. The same three protein toxins also were obtained from the extracellular protein extract. There was only a single band for any of toxins above, but the results of SDS-PAGE showed four bands for toxin Ⅰ, three bands for toxin Ⅱ and one band for toxin Ⅲ, respectively. Bioassay results indicated that the oral insecticidal activity of toxin Ⅱ was higher than that of toxin Ⅰ to *Helicoverpa armigera* neonates. The injectable hemocoelic potency (LD_{50}) of toxin Ⅲ was 0.18 μg/larva against *Galleria mellonella* fifth-instar larvae. The toxicity of toxin Ⅱ was stable under 50℃ in 10 min. The toxin Ⅲ was heat-stable to 70℃ in 10 min.

Key words: *Xenorhabdus nematophila*; protein toxins; purification; insecticidal activity

嗜线虫致病杆菌 *Xenorhabdus nematophila* 属于肠杆菌科、革兰氏阴性细菌,是与小卷蛾斯氏线虫 *Steinernema carpocapsae* 共生的昆虫病原细菌。已有的研究表明,嗜线虫致病杆菌中的多个品系不仅有很强的血腔活性,而且还具有广谱的胃毒活性(李秀花等,2004)。到目前为止,国内外在昆虫病原线虫共生菌杀虫毒素的研究方面,仅仅对来自发光杆菌 *Photorhabdus luminescens* W14 菌株的 Tc 毒素蛋白进

基金项目:国家自然科学基金项目(30400296);河北农业大学重点基金"9816"项目
作者简介:王勤英,女,1962 年生,河北藁城人,教授,博士,主要从事昆虫病原微生物研究,E-mail:wqinying@yahoo.com.cn
收稿日期 Received:2004-06-17;接受日期 Accepted:2004-10-18

行了较为深入的研究(Bowen *et al*., 1998; Blackburn *et al*., 1998; Guo *et al*., 1999; Ffench-Constant and Bowen, 2001)。有关嗜线虫致病杆菌杀虫毒素方面的报道还很少,已有的报道仅有来自嗜线虫致病杆菌 BJ 品系的 Xin 毒素蛋白复合物(Pan *et al*., 2002)、来自 A24 品系的 42 kD 血腔毒素蛋白(Brown *et al*., 2004)及溶血素(Brillard *et al*., 2001)。最近对嗜线虫致病杆菌杀虫蛋白基因的克隆与表达及功能的研究较为深入(Morgan *et al*., 2001; Sergeant *et al*., 2003; 崔龙等,2003)。

我们利用盐析和非变性凝胶电泳(native-PAGE)等方法对嗜线虫致病杆菌 HB310 菌液中的杀虫毒蛋白进行了分离纯化,对其杀虫活性及热稳定性进行了测定。嗜线虫致病杆菌杀虫毒素的研究将有助于揭示昆虫病原线虫共生菌的杀虫机理,也将为新的微生物杀虫资源的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及昆虫

嗜线虫致病杆菌 HB310 菌株、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 和大蜡螟 *Galleria mellonella* 均由河北农业大学害虫生物防治实验室提供。

1.2 菌液的培养及各测定液的制备

将菌种接种于 NBTA 培养基(营养琼脂 45 g,溴百里酚蓝 0.025 g,氯化三苯基四氮唑 0.04 g,水 1 000 mL,pH 7.2~7.4)平板上,在 28℃培养 36 h~48 h,挑取 Ⅰ 型菌单菌落接入 5 mL 牛肉汤培养基(牛肉蛋白胨 10 g,牛肉膏 3 g,氯化钠 5 g,水 1 000 mL,pH 7.2~7.4)中,于 28℃、200 r/min 振荡培养过夜,再按 1% 接菌量转接于牛肉汤培养基中,在 28℃、200 r/min振荡培养 48 h,4℃保存备用。

菌液上清液、细胞和胞内上清液的制备:取部分上述培养好的菌液在 15 294 × g、4℃离心 15 min,吸取上清液并经 0.45 μm 滤膜过滤得菌液上清液;离心后所得细胞沉淀加适量的 PBS(磷酸缓冲液)在 10 621 × g、4℃离心 15 min,洗涤 2 次后,取一部分细胞用 PBS 重新悬浮至与原菌液同样的浓度备用;剩余部分经超声波破碎后 15 294 × g、4℃离心 15 min,取上清液经 0.45 μm 滤膜过滤后为胞内上清液。直接用于生物测定或蛋白提取。

1.3 杀虫蛋白的分离纯化

1.3.1 胞内和胞外蛋白的提取:将 1.2 节中得到的胞外上清液和胞内上清液通过 85% 硫酸铵盐析(郭晓君,2001)分别提取胞外和胞内蛋白,最后得到的蛋白提取物置于 -20℃保存备用。

1.3.2 胞内和胞外蛋白提取物的 native-PAGE 电泳:将经过硫酸铵盐析后所得的胞内和胞外蛋白提取物,分别通过 PAGE 制备性电泳进一步分离纯化。native-PAGE 采用 5% 浓缩胶和 6% 分离胶。胶、电泳缓冲液和染色液的配制及蛋白质条带的定位及蛋白样品的洗脱均参照郭尧君(2001)方法和 Marshak 等(1999)方法。分离纯化的各蛋白组分别置于 -20℃保存备用。

1.3.3 蛋白含量的测定:采用考马斯亮蓝法(郭尧君,2001)。

1.4 杀虫蛋白的 SDS-PAGE

分别对从胞外和胞内蛋白提取物中分离出的毒素蛋白进行 SDS-PAGE 电泳。电泳采用 5% 浓缩胶、8% 分离胶,胶、电泳缓冲液和染色液的配制参照郭尧君(2001)方法。

1.5 生物测定

1.5.1 菌液中各测定液胃毒活性的测定:以棉铃虫初孵幼虫为试虫,以原菌液、细胞上清液、胞内上清液、胞内蛋白提取物、胞外上清液和胞外蛋白提取物为处理样品(生测用的所有组分均配成与原菌液中含量相同的浓度),以无菌牛肉汤培养基为对照。每一处理设 3 次重复,每重复 24 头幼虫。每处理按 1(V):10(W)的比例混合样品和饲料,混匀后分装于 24 孔生测板内,每孔放 1 头幼虫,覆盖一层保鲜膜和两层纸巾,盖上盖,置于(26 ± 1)℃、14 h 光照的生化培养箱中。120 h 时记录活虫数并称量活虫体重,分别计算生长抑制率和校正死亡率。

生长抑制率 =(对照平均体重 - 处理平均体重)/(对照平均体重 - 初始幼虫平均体重)× 100%,初孵幼虫的体重忽略不计。

校正死亡率 =(处理幼虫死亡率 - 对照幼虫死亡率)/(1 - 对照幼虫死亡率)× 100% 。

1.5.2 native-PAGE 电泳分离的蛋白胃毒活性的测定:以棉铃虫初孵幼虫为试虫,以 native-PAGE 电泳分离的各个蛋白组分为处理样品,以空白胶离心后得到的上清液为对照,蛋白样品和棉铃虫人工饲料按 1:10 的比例混合均匀,分装于 24 孔生测板中,初测每个处理 24 头幼虫,置于(26 ± 1)℃、14 h 光照的生化培养箱中。第 5 天记录活虫数并称量活虫体重。初测中对棉铃虫幼虫的生长抑制作用或死亡率偏高的样品再进行复筛(胞内复筛蛋白样品的浓度调整到 50 μg/mL、胞外复筛蛋白样品浓度调整到 30

μg/mL)，复筛每一处理设 3 次重复，每重复 24 头幼虫，共 72 头幼虫，其余处理同初筛。

1.5.3　毒素蛋白的胃毒毒力 LD_{50} 测定 将经硫酸铵盐析后得到的胞内和胞外蛋白提取物用 PBS 逐级稀释成 6 个浓度梯度，以 PBS 为对照，每个处理 72 头幼虫，按 1.5.1 节方法对初孵棉铃虫做口服毒力的测定，记录 120 h 时的死亡虫数，计算 LD_{50}。

1.5.4　native-PAGE 分离的蛋白血腔活性的测定 用 25 μL 的微量注射器吸取 10 μL 蛋白样品，以空白胶离心后得到的上清液为对照，从 5 龄大蜡螟的第 1 对腹足之间注射到其体腔内，每处理重复 3 次，每个重复 15 头幼虫，注射后放在培养皿中，不再给予人工饲料，置于(26 ± 1)℃、14 h 光照的生化培养箱中培养，每天记录其死亡虫数。

1.5.5　毒素蛋白的血腔毒力 LD_{50} 测定 分别将经硫酸铵盐析后得到的胞内和胞外的蛋白提取物及 native-PAGE 电泳分离到的血腔毒素蛋白用 PBS 逐级稀释成 6 个浓度梯度，以 PBS 为对照，每个处理 45 头幼虫，按 1.5.4 节方法对 5 龄大蜡螟幼虫进行血腔注射，记录 72 h 死虫数，计算 LD_{50}。

1.6　毒素蛋白的热稳定性测定

将毒素蛋白样品分别放于 25℃、50℃、70℃、80℃、100℃恒温水浴中，10 min 后取出作为供试样品，设无菌水为空白对照，按 1.5.1 节和 1.5.4 节方法分别测定不同处理对初孵棉铃虫幼虫的胃毒活性及对大蜡螟的血腔活性。

1.7　数据分析

采用 DPS 数据处理系统进行 Duncan's 新复极差多重比较分析(唐启义和冯明光，2002)。

2　结果与分析

2.1　杀虫蛋白的分离纯化

将硫酸铵盐析后得到的胞内和胞外总蛋白提取物分别用 native-PAGE 进一步分离(图 1)，从 native-PAGE 凝胶上仔细切下每一个区带，取洗脱后的蛋白进行胃毒活性和血腔活性的测定，结果发现无论是胞内蛋白还是胞外蛋白，有活性的蛋白条带位置是一样的，均为点样孔下Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ号条带中的蛋白，其他条带中的蛋白均没有测出任何杀虫活性(未列出)。Ⅰ和Ⅱ号条带中的蛋白具有胃毒活性，分别被命名为毒素Ⅰ和毒素Ⅱ；具有血腔活性的Ⅲ号条带中的蛋白被命名为毒素Ⅲ。

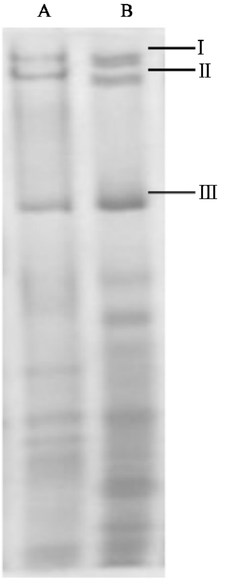

图 1　胞内和胞外蛋白提取物的 native-PAGE 图谱

Fig. 1　Native-PAGE of HB310 protein extracts

A：胞外蛋白提取物 Extracellular protein extract；

B：胞内蛋白提取物 Intracellular protein extract.

2.2　杀虫蛋白的 SDS-PAGE

对经 native-PAGE 分离纯化的毒素Ⅰ、毒素Ⅱ和毒素Ⅲ，用冷冻干燥的方法浓缩后，分别进行 native-PAGE 和 SDS-PAGE，结果见图 2 和图 3。

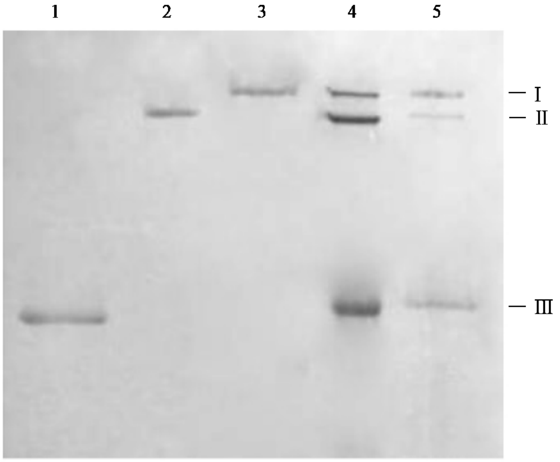

图 2　分离回收的毒素蛋白 native-PAGE 图谱

Fig. 2　Native-PAGE back-check of isolated proteins

1. 毒素Ⅲ Toxin Ⅲ；2. 毒素Ⅱ Toxin Ⅱ；

3. 毒素Ⅰ Toxin Ⅰ；4. 胞内蛋白提取物 Intracellular protein extract；

5. 胞外蛋白提取物 Extracellular protein extract.

由图 2 可以看出，回收的毒素Ⅰ、毒素Ⅱ和毒素Ⅲ经 native-PAGE 检测证实没有杂带，其大小与原胞内和胞外回收蛋白一致。这 3 种毒素蛋白经 SDS-PAGE 检测显示毒素Ⅰ可分辨出 4 个条带(55 ~ 170 kD)，毒素Ⅱ可分辨出 3 个条带(55 ~ 250 kD)，毒素

Ⅲ只有 1 个条带,可能是单体蛋白,其分子量约为 65 kD (图 3)。

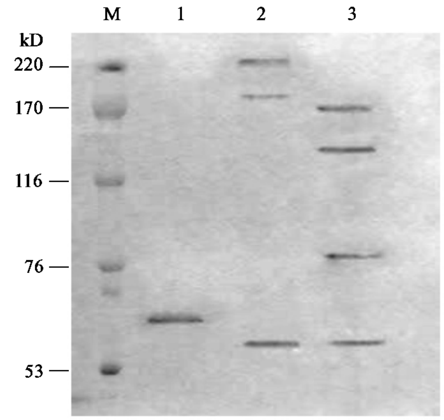

图 3 毒素蛋白的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 3 SDS-PAGE spectrum of protein toxins

M:标准分子量 Protein marker;1. 毒素Ⅲ Toxin Ⅲ; 2. 毒素Ⅱ Toxin Ⅱ;3. 毒素Ⅰ Toxin Ⅰ.

2.3 菌液中各测定液及毒素蛋白的杀虫活性

将经盐析后得到的胞内和胞外蛋白提取物再稀释回与原菌液同样的浓度,测定其胃毒活性,与原菌液、活细胞及上清液进行比较,结果见表 1。由表 1 可以看出,HB310 菌液经 85% 硫酸铵沉淀、透析去掉小分子物质后,其蛋白提取物的杀虫活性没有明显的变化。活细胞、细胞破碎离心后的胞内上清液及胞内蛋白提取物对棉铃虫初孵幼虫的生长抑制率分别为 97.74%、97.61% 和 97.46%,三者间无显著差异。胞外上清液和其蛋白提取物对棉铃虫的生长抑制率分别为 94.59% 和 92.96%,差异也不显著。所有测试样品对初孵棉铃虫的致死作用都很低,最高的死亡率仅为 23.62%,样品间差异不显著。由此可以看出该菌液的胞内和胞外上清液中都含有口服杀虫活性物质,而且该类杀虫活性物为大分子物质,存在于蛋白提取物中。

由表 2 可知,胞内蛋白提取物和胞外蛋白提取物对棉铃虫初孵幼虫的 LD_{50} 值分别为 406.42 μg/g (人工饲料)和 110.85 μg/g,前者的 LD_{50} 值比后者的高出近 4 倍。由表 3 可见,胞内蛋白提取物和胞外蛋白提取物对大蜡螟 5 龄幼虫的血腔注射活性(LD_{50})分别为 71.13 μg/头和 11.14 μg/头,前者的 LD_{50} 比后者的高出近 7 倍;而经进一步分离纯化的毒素Ⅲ对大蜡螟幼虫有很强的血腔毒力,LD_{50} 为 0.18 μg/头。但这并不说明胞内蛋白的胃毒活性或血腔活性低于胞外蛋白,因为本实验测定的是胞内或胞外的总蛋白,而有杀虫活性的毒素蛋白在其中只占很小的一部分。

表 1 HB310 菌液各样品对棉铃虫初孵幼虫口服胃毒活性(120 h)

Table 1 Oral toxicity of HB310 strain to *Helicoverpa armigera* neonates at 120 h

供试样品 Samples	生长抑制率(%) Growth inhibition rate	校正死亡率(%) Corrected mortality
原菌液 Culture broth	98.82 ± 0.29 a	15.28 ± 3.93 a
活细胞 Cell	97.74 ± 1.10 a	8.33 ± 1.96 a
胞内上清液 Intracellular supernatant	97.61 ± 3.20 a	23.62 ± 5.21 a
胞内蛋白提取物 Intracellular protein extract	97.46 ± 0.66 a	15.28 ± 5.20 a
胞外上清液 Extracellular supernatant	94.59 ± 0.47 b	15.45 ± 0.85 a
胞外蛋白提取物 Extracellular protein extract	92.96 ± 0.45 b	6.98 ± 3.93 a

注:表中数据为平均值 ± *SE*;同一列数据后的字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。表 3 ~ 5 同。

Notes: The data in the table are mean ± *SE*; the means in the same column followed by different letters are significantly different at $P < 0.05$. The same for Tables 3 – 5.

表 2 HB310 菌液胞内和胞外蛋白提取物对初孵棉铃虫幼虫口服毒力(LD_{50})

Table 2 Oral LD_{50} of protein extracts of *Xenorhabdus nematophila* HB310 against *Helicoverpa armigera* neonates at 120 h

蛋白提取物 Protein extract	LD_{50} (μg /g diet)	剂量-死亡率回归方程 Dose-mortality probit ($y = a + bx$)	标准误差 *SE*	95%置信限 95% Fiducial limits
胞内蛋白提取物 Intracellular protein extract	406.42	$y = 0.0630 + 1.9406x$	0.038	342.29 ~ 482.57
胞外蛋白提取物 Extracellular protein extract	110.85	$y = 2.5032 + 1.2211x$	0.0581	85.14 ~ 144.32

表 3　蛋白提取物对大蜡螟 5 龄幼虫血腔注射毒力(LD_{50})

Table 3　LD_{50} of protein extracts of *X*. *nematophila* HB310 by injection against *G*. *mellonella* five-instar larvae

蛋白提取物 Protein extracts	LD_{50} (μg/头)	剂量-死亡率回归方程 Dose-mortality probit ($y = a + bx$)	标准误差 *SE*	95%置信限 95% Fiducial limits
胞内蛋白提取物 Intracellular protein extract	71.13	$y = -5.2969 + 5.5596x$	0.0177	65.68 ~ 77.05
胞外蛋白提取物 Extracellular protein extract	11.14	$y = -3.8084 + 8.4153x$	0.0113	10.58 ~ 11.72
毒素Ⅲ Toxin Ⅲ	0.18	$y = 3.9445 + 4.0781x$	0.0086	0.16 ~ 0.21

从胞内或胞外蛋白提取物中分离出的毒素Ⅱ对初孵棉铃虫幼虫的口服胃毒活性都是最强的,其次为毒素Ⅰ;经毒素Ⅱ处理的存活幼虫平均体重明显低于对照(表 4)。从胞内和胞外蛋白提取物中分离出的毒素Ⅲ都有较强的血腔活性,每头 5 龄大蜡螟幼虫注射 10 μL 胞内和胞外毒素Ⅲ样品,48 h 大蜡螟幼虫的死亡率分别达到 100%和 72.27%。胞内毒素Ⅲ(蛋白含量 50 μg/mL)和胞外毒素Ⅲ(蛋白含量 30 μg/mL)杀虫活性的差异是由于两个样品中蛋白含量差异造成的。

表 4　Native-PAGE 分离回收的毒素蛋白对棉铃虫初孵幼虫的胃毒活性(120 h)

Table 4　Oral toxicity of proteins isolated from native-PAGE gel against *H*. *armigera* neonates

毒素蛋白 Protein toxins	存活幼虫平均体重(mg) Average weight	
	胞内蛋白(50 μg/mL) Intracellular proteins	胞外蛋白(30 μg/mL) Extracellular proteins
对照 CK	9.37 ± 2.20 a	8.50 ± 1.29 a
毒素Ⅰ Toxin Ⅰ	1.16 ± 0.10 cd	2.20 ± 0.16 c
毒素Ⅱ Toxin Ⅱ	0.33 ± 0.01 d	0.58 ± 0.11 cd
毒素Ⅲ Toxin Ⅲ	4.94 ± 0.21 b	6.06 ± 1.05 b

2.4　毒素蛋白的热稳定性

毒素Ⅱ在 25 ~ 50℃处理 10 min,其口服杀虫活性仍很稳定;70℃处理 10 min 后,杀虫活性开始明显下降,对初孵棉铃虫幼虫的生长抑制率由 94.21%下降到 80.04%;80℃和 100℃处理 10 min 后,其杀虫活性几乎完全丧失。对胞内和胞外蛋白提取物的处理结果也与之相同(表 5)。说明毒素Ⅱ仅耐 50℃处理 10 min,在此温度下延长处理时间对胃毒素有何影响还需进一步测定。

由表 6 可以看出,毒素Ⅲ在 70℃处理 10 min 仍能保持原有的血腔毒性,在 80℃处理 10 min 后,其杀虫活性明显下降,死亡率由 93.3%下降到 43.3%,100℃处理 10 min 其杀虫活性完全丧失。胞内蛋白提取物的热稳定性与毒素Ⅲ一致,而胞外蛋白提取物在 70℃处理 10 min 后杀虫活性下降很显著,其原因还有待进一步探索。

表 5　温度对 HB310 菌株毒素蛋白口服毒性的影响

Table 5　The effect of temperature on oral insecticidal activity of protein toxins

温度(℃) Temperatures	120 h 时平均生长抑制率(%) Growth inhibition rate at 120 h		
	胞内蛋白提取物 Intracellular protein extract	胞外蛋白提取物 Extracellular protein extract	毒素Ⅱ Toxin Ⅱ
25	95.35 ± 0.59 a	86.2 ± 2.02 a	93.90 ± 0.81 a
50	94.55 ± 0.67 a	84.51 ± 1.80 a	94.21 ± 0.73 a
70	88.63 ± 2.13 b	68.09 ± 4.80 b	80.04 ± 1.09 b
80	17.45 ± 1.65 c	28.28 ± 3.95 c	2.56 ± 0.14 c
100	9.50 ± 1.21 d	19.45 ± 0.51 d	-

表 6　温度对 HB310 菌株毒素蛋白血腔毒性的影响

Table 6　The effect of temperature on haemocoel insecticidal proteins

温度(℃) Temperature	48 h 校正死亡率(%) Corrected mortality at 48 h		
	胞内蛋白提取物 Intracellular protein extract	胞外蛋白提取物 Extracellular protein extract	毒素Ⅲ Toxin Ⅲ
25	100 a	100 a	100 a
50	100 a	100 a	100 a
70	100 a	36.7 b	93.3 a
80	76.7 b	0 c	43.3 b
100	0 c	0 c	0 c
PBS (CK)	0	0	0

3　讨论

本实验利用盐析及 native-PAGE 等方法分离纯化出 1 种血腔毒素蛋白和 2 种胃毒素蛋白。SDS-PAGE 分析显示 2 个胃毒素蛋白是由 3 ~ 4 个多肽组成的复合蛋白,血腔毒素只分离出一个约 65 kD 的蛋白条带。生物测定结果表明嗜线虫致病杆菌 HB310 菌株中胞内和胞外上清液中都存在有这 3 种杀虫毒素。Khandelwal 和 Banerjee-Bhatnagar(2003)研究发现嗜线虫致病杆菌的杀虫活性物质的分泌与细胞的外膜囊泡有关,在透射电子显微镜下观察到菌体细胞外面分布有小囊泡,囊泡中含有直径为 20 ~

100 nm 的大分子复合物。菌体活细胞和囊泡内蛋白对棉铃虫初孵幼虫都有杀虫活性，说明杀虫毒素是通过外膜囊泡的方式分泌到培养基中的。由于在细胞内合成的毒素蛋白一部分已经分泌到胞外，一部分暂时还留在胞内，因此从胞内和胞外上清液中都分离到杀虫毒素。

已有的研究表明，在昆虫病原线虫共生菌中起主要杀虫作用的活性成分是蛋白类毒素，而且大多是复合蛋白（Ffench-Constant and Bowen，2001），因此在分离纯化毒素蛋白的过程中，最关键的是如何保持其杀虫活性。Bowen 等（1998）通过超滤、DEAE 离子交换层析及高效液相色谱的方法，成功地从发光杆菌 W14 菌株中分离出 4 种毒素蛋白（Tca、Tcb、Tcc 和 Tcd），SDS-PAGE 分析表明每种毒素由多个亚基组成，均为高分子量的复合蛋白。Pan 等（2002）利用类似的方法从嗜线虫致病杆菌 BJ 品系的胞内分离到的 Xin 毒素也是一种大分子量复合毒素蛋白。对来自发光杆菌 W14 菌株、嗜线虫致病杆菌 PMFI296 和 BP 菌株杀虫基因的功能分析也证实，共生菌对昆虫口服杀虫活性需要多个基因的联合表达（Morgan *et al*.，2001；Waterfield *et al*.，2002；Sergeant *et al*.，2003）。本实验中分离到的 2 个具有胃毒活性的毒素Ⅰ和毒素Ⅱ均含有多个多肽，说明该类毒素可能也是复合蛋白，但也不能排除其他非毒素蛋白的存在。

Brown 等（2004）通过构建粘粒文库的方法从嗜线虫致病杆菌 A24 中获得一个具有血腔活性的基因，将该基因重组表达后得到一个 42 kD 的血腔毒素，通过对注射该毒素的昆虫的组织病理学研究表明，其作用位点是昆虫的中肠。本实验得到的血腔毒素分子量约为 65 kD，将该毒素注射到大蜡螟幼虫血腔后，大蜡螟幼虫体色很快变成黑灰色，血细胞变成碎片，但未发现该毒素对中肠组织有任何影响（待发表）。这两种毒素之间是否有关系还有待进一步研究。

参 考 文 献（References）

Blackburn M，Golubeva E，Bowen D，Ffrench-Constant RH，1998. A novel insecticidal toxin from *Photorhabdus luminescens*，toxin complex a (Tca)，and its histopathological effects on the midgut of *Manduca sexta*. *Appl. Environ. Microbiol*.，64：3 036 – 3 041.

Bowen D，Rocheleau TA，Blackburn M，Andreev O，Golubeva E，Bhartia R，Ffrench-Constant RH，1998. Novel insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Science*，280：2 129 – 2 132.

Brillard J，Ribeiro C，Boemare N，Brehélin M，Givaudan A，2001. Two distinct hemolytic activities in *Xenorhabdus nematophila* are active against immunocompetent insect cells. *Appl. Environ. Microbiol*.，67：2 515 – 2 525.

Brown SE，Cao AT，Hines ER，Akhurst RJ，East PD，2004. A novel secreted protein toxin from the insect pathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophila*. *J. Biol. Chem*.，279：14 595 – 14 601.

Cui L，Qiu LH，Xin ZH，Fang YY，Guo W，Pang Y，2003. Importance of five genes presented in *Xenorhabdus nematophila* BP toxin gene cluster to its insecticidal activity. *Acta Microbiologica Sinica*，43(6)：747 – 752.［崔龙，丘礼鸿，辛智海，房媛媛，郭巍，庞义，2003. 昆虫病原线虫共生菌 *Xenorhabdus nematophila* BP 品系杀虫毒素基因簇各 ORF 与杀虫活性的关系. 微生物学报，43(6)：747 – 752］

Ffrench-Constant RH，Bowen DJ，2001. Novel insecticidal toxins from nematode-symbiotic bacteria. *Cell Mol. Life Sci*.，57：828 – 833.

Guo LN，Fatig RO Ⅲ，Orr GL，Schafer BW，Strickland JA，Sukhapinda K，Woodsworth AT，Petell JK，1999. *Photorhabdus luminescens* W-14 insecticidal activity consists of at least two similar but distinct proteins. Purification and characterization of toxin A and toxin B. *J. Biol. Chem*.，274：9 836 – 9 842.

Guo YJ，2001. Experimental Technique of Protein Electrophoresis. Beijing：Science Press. 54 – 157.［郭尧君，2001. 蛋白质电泳实验技术. 北京 科学出版社. 54 – 157］

Khandelwal P，Banerjee-Bhatnagar N，2003. Insecticidal activity associated with the outer membrane vesicles of *Xenorhabdus nematophilus*. *Appl. Environ. Microbiol*.，69：2 032 – 2 037.

Li XH，Wang QY，Lu XJ，Li GX，2004. Susceptivity of different host insects to symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes. *Entomological Knowledge*，41(1)：39 – 42.［李秀花，王勤英，陆秀君，李国勋，2004. 不同昆虫寄主对昆虫病原线虫共生菌的敏感性比较. 昆虫知识，41(1)：39 – 42］

Marshak DR，Kadonaga JT，Burgess RR，Kunth MW，Brennan WA，Lin SH，1999. Strategies for Protein Purification and Characterization：A Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Morgan JAW，Sergeant M，Ellis D，Ousley M，Jarrett P，2001. Sequence analysis of insecticidal genes from *Xenorhabdus nematophilus* PMFI296. *Appl. Environ. Microbiol*.，67：2 062 – 2 069.

Pan YH，Jian H，Zhang J，Liu Z，Chen ZY，Yang XF，Yang HW，Huang DF，2002. An intracellular protein (Xin) with remarkable inhibition on growth of *Helicoverpa armigera* was isolated from *Xenorhabdus nematophilus* strain BJ. *Prog. Nat. Sci*.，12：310 – 312.

Sergeant M，Jarrett P，Ousley M，Morgan JAW，2003. Interactions of insecticidal toxin gene products from *Xenorhabdus nematophilus* PMFI296. *Appl. Environ. Microbiol*.，69：3 344 – 3 349.

Tang QY，Feng MG，2002. DPS Data Processing System for Practical Statistics. Beijing：Science Press. 1 – 664.［唐启义，冯明光，2002. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统. 北京：科学出版社. 1 – 664］

Waterfield NR，Daborn PJ，Ffrench-Constant RH，2002. Genomic islands in *Photorhabdus*. *Trends in Microbiology*，10：541 – 545.

（责任编辑：黄玲巧）